Untersuchungen über das Prinzip der Enzyminduktion

Beeinflussung der L-Aminosäureoxydase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase durch Cortisol

Hans Eichinger

1968

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS PRINZIP DER ENZYMINDUKTION

Beeinflussung der L-Aminosäureoxydase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase durch Cortisol

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Hans Eichinger
aus
Eggenfelden

München 1968

Dekan: Prof. Dr. Johann Kalich

Referent: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. Johannes Brüggemann

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Karl Zipf

Tag der Promotion: 29. 2. 1968

UNIV. LEIDEN BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATUR	3
III.	MATERIAL UND METHODIK	8
	1. Verwendete Präparate	8
	2. Tiermaterial	8
	3. Erfassung der L-Aminosäureoxydase	9
	4. Bestimmung der Butyryl-CoA-Dehydrogenase	11
	5. Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)	14
IV.	ERGEBNISSE	16
	1. Beziehung zwischen L-Aminosäureoxydase-Aktivität und Induktion der Tryptophanpyrrolase	16
	2. Hemmung der L-Aminosäureoxydase und Butyryldehydrogenase durch Actinomycin C	16
	3. Induktion der Glutamat-Pyruvat-Transaminase durch Substrat	19
V.	DISKUSSION	27
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	31
	Conclusion	32
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	33
	LEBENSLAUF	37

Verwendete Abkürzungen

Amino-N	=	Aminosäurenstickstoff
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
GPT	=	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
LDH	=	Lactatdehydrogenase
NADH	=	Nikotinamidadenindinukleotid (hydriert)
nm	=	nano-Meter = 10^{-9} Meter
RNS	=	Ribonukleinsäure
TKT	=	Tyrosin-α-Ketoglutarat-Transaminase
Tris	=	Trishydroxymethylaminomethan

I. EINLEITUNG

Die Regulierung der Enzyminduktion steht z. Z. im Brennpunkt biochemischer Erörterungen. Durch die Theorie von JAKOB und MONOD (1) über das Prinzip der Informationsübertragung aus dem Zellkern in den cytoplasmatischen Raum schien die erfolgreiche Bearbeitung aller bisher ungelösten Regulationsprobleme möglich zu sein. Die Information für die Synthese aller cytoplasmatischen Enzyme mußte im Zellkern vorliegen. Daher war zwangsläufig zu fordern, daß die Kenntnis des Prinzips der Informationsübertragung auch zu einer Klärung des theoretisch schwer verständlichen, aber biologisch so außerordentlich sinnvollen Prozesses der Enzymadaptation führen müßte: Jede Zelle ist ja normalerweise in der Lage, sich sehr schnell an vorgegebene Umweltbedingungen (Ernährung, Belastung etc.) anzupassen, und zwar durch Schaffung von Enzymmustern, die für die stoffwechselmäßige Bewältigung dieser Umweltbedingungen benötigt werden. Das gesamte Enzymmaterial der Zelle unterliegt also einem kontinuierlichen Auf-, Ab- und Umbau, aus dem die jeweils benötigten Enzymmuster resultieren. Treten in diesem Zusammenhang neue Enzyme auf, die bisher nicht oder nur in beschränktem Umfang benötigt wurden, so spricht man von Enzyminduktion, werden unnötig gewordene Fermente eliminiert, von Enzymrepression.

Diese Adaptation des Enzymmaterials kann durch das Auftreten der entsprechenden Substrate eingeleitet werden, wie aus umfangreichen Versuchen an Mikroorganismen hervorgeht (2; 3). Biologisch gesehen befriedigt dieses Steuerungssystem, weil immer die Katalysatoren synthetisiert werden, die gegenwärtig erforderlich sind. Alle anderen fallen der Proteolyse anheim. Beim höheren Organismus hat es sich nun gezeigt, daß auch Hormone die Induktion bestimmter Enzymspektren einleiten.

Hier ist die Frage gestellt worden, ob die Hormonwirkung direkt in das Prinzip der Informationsübertragung eingreift oder ob sich die Enzymmuster auch hier den Substratspiegeln anpassen, die - hormonabhängig - durch Aktivierung oder Hemmung von Schrittmacher-Enzymen eingestellt werden könnten.

Für beide Alternativen liegen Anhaltspunkte vor. CLEVER und KARLSON (4) fanden beim Experimentieren mit dem Insektenhormon Ecdyson morphologische

Veränderungen an den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen von Chironomus tentans, die im angelsächsischen Schrifttum als "Puff" bezeichnet werden und als Orte einer intensiven DNS-abhängigen RNS-Synthese anzusehen sind (BEERMANN (5)). Die vom Ecdyson induzierten Puffs stimmen genau mit denjenigen überein, die im Rahmen des normalen Verpuppungsprozesses angetroffen werden. In späteren Versuchen fanden JUNGBLUT u. Mitarb. (6), daß tritiummarkiertes Östradiol von den Zellkernen des Rattenuterus spezifisch angereichert wird. Andere Autoren konnten nach Cortisolgaben zusammen mit dem Auftreten neuer Enzyme eine Stimulierung der Boten-RNS-Synthese nachweisen (7; 8). Alle diese Befunde führten zu der Hypothese, daß dem Hormon eine direkte Wirkung auf das Gen zuzuerkennen sei (9).

Andere Untersucher berücksichtigen die zweite Möglichkeit. Nach SCHOLE (10) läßt sich die Aktivität gelber Fermente, die als Schrittmacherenzyme des Mitochondrienstoffwechsels angesehen werden können, durch Hormone beeinflussen. Anabole Hormone (z.B. STH, Insulin) hemmen, katabole (z.B. Cortisol) stimulieren diese Enzymgruppe. Am empfindlichsten reagiert die L-Aminosäureoxydase, die für den Proteinstoffwechsel besonders bedeutungsvoll ist, weil sie bevorzugt essentielle Eiweißbausteine umsetzt. SCHOLE nimmt daher an, daß sich beispielsweise die Cortisolwirkung primär in einer Beschleunigung der oxydativen Desaminierung essentieller Aminosäuren manifestiert, was eine Störung der Proteinsynthese zur Folge hat. Die Reaktionsprodukte des Aminosäureabbaus und die aufgrund der gestörten Eiweißsynthese anfallenden Aminosäuren (11) könnten dann sekundär die entsprechende Neubildung von Enzymen veranlassen.

Um nun entscheiden zu können, welche von beiden Alternativen zutrifft, war es in erster Linie notwendig, die postulierte Korrelation zwischen Enzyminduktion und L-Aminosäureoxydase-Aktivität zu demonstrieren. In der vorliegenden Arbeit soll - z.T. in Zusammenarbeit mit BREM (12) - versucht werden, hierzu einen Beitrag zu liefern. Als Testenzyme wurden einerseits die Tryptophanpyrrolase (BREM) und andererseits die Glutamat-Pyruvat-Transaminase herangezogen.

II. LITERATUR

Zum Thema L-Aminosäureoxydase und Enzyminduktion liegen bisher noch keine Literaturangaben vor. Die Beeinflussung der Aminosäureoxydation durch Hormone wurde bisher nur im Institut für Tierphysiologie der Universität München untersucht. Nach Versuchen von WEIK (13) und SCHOLE (10; 14) wird die Aktivität dieses Enzyms durch Insulin (0,1 IE s.c.; Ratten, 100 - 150 g Körpergewicht) innerhalb von 20 Minuten um ca. 70 - 80 % vermindert. Wurden 10 IE verabreicht, so war die Hemmung in 20 Minuten vollständig (WEIK (13)). Weiterhin liegen erste Rattenversuche über die entgegengesetzte Reaktion, nämlich die Aktivierung der L-Aminosäureoxydase durch Nebennierenrindenhormone vor (10). Nach Verabreichung von 5 mg Cortisol p.o. (Schlundsonde) war die Aktivität dieses Enzyms innerhalb von 6 Stunden um 80 - 90 % gesteigert. Neuere Ergebnisse von WIEDEMANN (15) zeigen weiterhin, daß derselbe Cortisol-Effekt auch in vitro nachweisbar ist. Ebenso ließ sich die Insulinwirkung in vitro reproduzieren. Es handelt sich demnach bei diesen Hormonwirkungen nicht um eine Enzyminduktion bzw. -repression, sondern um direkte Aktivitätsänderungen des Fermentes. Damit ist natürlich über eine eventuelle Beziehung zwischen der Adaptation zellulärer Enzymmuster und der L-Aminosäureoxydase-Aktivität noch nichts ausgesagt. In der vorliegenden Arbeit soll daher an erster Stelle überprüft werden, ob sich eine derartige Korrelation nachweisen läßt.

Die Induktion der Tryptophanpyrrolase durch Cortisol und Substrat wurde von BREM (12) untersucht. Die in diesem Zusammenhang vorliegende Literatur wird entsprechend dort referiert. Besonders erwähnt sei hier nur die immer wieder beobachtete Tatsache, daß die Cortisol- und die Substratinduktion auf Hemmstoffe der Protein- bzw. der RNS-Synthese unterschiedlich ansprechen (vgl. hierzu auch BREM (12)). Das Antibiotikum Puromycin, das die Proteinsynthese hemmt, unterbindet sowohl die Hormon- als auch die Substratinduktion. Actinomycin dagegen, ein Antibiotikum, das die RNS-Synthese inhibiert, schränkt ausschließlich die Cortisolinduktion ein (16; 17). Diese Unterschiede schienen in besonderem Maße geeignet zu sein, die These von der direkten Beeinflussung der Boten-RNS-Synthese durch Cortisol zu stützen. Es wurde aber schon eingangs erwähnt, daß die L-Aminosäureoxydase auf bestimmte Hemmstoffe außerordentlich empfindlich reagiert. OTTE (18), STÖSSEL (19) und SCHOLE (14) untersuchten z.B. die Wirkung zahlreicher Hemmstoffe des PASTEUR-Effektes (KCN, NH_4^+-Ionen, Acetonitril,

2,4-Dinitrophenol) auf die Aktivität einiger Flavinenzyme des Mitochondrienstoffwechsels (L-Aminosäureoxydase, Acyl-Dehydrogenasen, NADH-Cytochrom c-Reduktase, Bernsteinsäuredehydrogenase). Aus allen Ergebnissen läßt sich eindeutig ableiten, daß die L-Aminosäureoxydase am empfindlichsten reagiert. Es bestand daher die Möglichkeit, daß auch Actinomycin - neben der hemmenden Wirkung auf die RNS-Synthese - die L-Aminosäureoxydation einschränkt. Sollte sich diese Vermutung bestätigen, so ließe sich die Hemmung der Cortisolinduktion durch Actinomycin auch über eine Herabsetzung der Aminosäureoxydation erklären, durch die nach der "Substrat-Theorie" (vgl. Seite 1) ebenfalls die Enzyminduktion unterdrückt werden müßte. An zweiter Stelle sollte daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob gelbe Fermente, insbesondere die L-Aminosäureoxydase, durch Actinomycin gehemmt werden, und zwar unter Zugrundelegung eines Konzentrationsbereiches, der für die Inhibierung der RNS-Synthese charakteristisch ist.

Von den Transaminasen, denen der dritte Teil der vorliegenden Arbeit gewidmet sein soll, sind im Rahmen des Induktionsproblems besonders die Tyrosin-α-Ketoglutarat-Transaminase (TKT) und die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) zu nennen.

Die Tyrosin-Transaminase wird in ähnlicher Weise wie die Trytophan-Pyrrolase (20; 21; 22) durch Cortisol und Substrat induziert (23; 24). Durch einmalige Zuführung von 50 mg Cortisol/kg Körpergewicht (Ratte) stieg die Aktivität innerhalb von 12 Stunden um etwa 900 %. 3,3 mMol L-Tyrosin/kg bewirkten in einem Zeitraum von 5 Stunden einen entsprechenden Anstieg der Transaminase-Aktivität um 400 - 900 %. Tryptophan ist seltsamerweise ähnlich effektiv, wohl als Folge einer Streßsituation, welche durch die relativ hohe Tryptophandosis geschaffen wird. Tatsächlich ist die einfache Zuführung eines Austauscher-Harzes ebenfalls mit einer Fermentstimulierung beantwortet worden.

Bei adrenalektomierten Tieren findet man nur 50 % der Aktivität des Normaltieres. Tyrosin (5 mMol/kg Körpergewicht) vermindert die Reaktionsgeschwindigkeit weiterhin, Cortisol (5 mg, Tötung nach 5 Stunden) erhöht dagegen bis auf den Wert, der auch beim Normaltier bei entsprechender Cortisolverabreichung beobachtet wird (25). Durch kombinierte Gabe von Cortisol und Tyrosin wird die Aktivität noch weiter gesteigert. Tyrosin scheint demnach nur in Gegenwart von Nebennierenrindenhormon induktionswirksam zu sein. Auch beim hypophysenlosen Tier ist 6 Monate nach der Hypophysenentfernung eine signifikante Induktion der Tyrosin-Transaminase nur mit Cortisol erzielbar (22).

Ähnlich wie bei den Untersuchungen über die Pyrrolaseinduktion (16; 17) wurde immunologisch kontrolliert, daß im Rahmen des Induktionsprozesses eine "de novo Synthese" von Enzymprotein stattfindet (26; 27). Die erforderlichen Antikörper konnten durch parenterale Übertragung gereinigter Transaminase auf Kaninchen erzeugt und aus der γ-Globulin-Fraktion des Serums gewonnen werden. Markierungsversuche, die den Einbau von ^{14}C-Leucin in das Enzymprotein verfolgen, belegen ebenfalls, daß die Transaminase nach Cortisol- bzw. Substrateinwirkung in größerem Umfang neu synthetisiert wird. Entsprechend ließ sich zeigen, daß Puromycin und Actinomycin die Cortisolinduktion herabsetzen (GREENGARD (28)). Der vergleichbare Versuch für die Substratinduktion fehlt bisher.

Besondere Aufmerksamkeit wurde in diesem Zusammenhang dem Coferment Pyridoxalphosphat geschenkt. Die Enzymaktivität läßt sich nämlich allein durch in vivo-Verabreichung des Coenzyms (200 mg/100 g Ratte; Tötung nach 4 Stunden) auf das drei- bis vierfache steigern. Dieser Effekt ist interessanterweise durch Puromycin, aber nicht durch Actinomycin hemmbar (28). Demnach wirkt sich die Pyridoxingabe ähnlich aus wie eine Substratapplikation. Ebenso ist eine maximale Cortisolinduktion bei der Pyridoxinmangel-Ratte nur möglich, wenn gleichzeitig Pyridoxalphosphat verabreicht wird (29). Allerdings liegt dieselbe maximale Enzymaktivitat auch vor, wenn das Coenzym nach der in vivo-Versorgung mit Cortisol in vitro dem Bestimmungsansatz zugesetzt wird (28). Die Enzyminduktion - also die spezifische Proteinsynthese - scheint demnach durch den Pyridoxinmangel nicht gestört zu sein.

Hinsichtlich der Glutamat-Transaminase wurden z.T. etwas andere Verhältnisse beobachtet. Die Induktion durch Cortisol (einmalig 50 mg/kg Ratte) erfolgt langsamer (Maximum nach 3 - 4 Tagen (24)). Eine Substratinduktion wurde dagegen praktisch nicht beobachtet. Allerdings ist nur Alanin bzw. Glutamat oder Alanin zusammen mit Glutamat verabreicht worden. Man sollte aber den Substrat-Effekt nur erwarten, wenn beide beteiligten Verbindungen - in diesem Fall Alanin + α-Ketoglutarat - in der Zelle anwesend sind. Allerdings wurde bei steigendem Proteingehalt der verfütterten Diät (0 - 75 % Protein) eine steigende Transaminase-Aktivität nachgewiesen. Eine Nebennierenreaktion kann ausgeschlossen werden, weil mit adrenalektomierten Tieren gearbeitet worden ist. Zusätzlich verabreichtes Cortisol wird parallel wirksamer (30). Aus diesen Ergebnissen ist zu ersehen, daß hohe Substratkonzentrationen (= hoher Proteinanteil in der Diät) doch die Transaminase-Induktion veranlassen.

Nach Adrenalektomie sinkt die Aktivität wie bei der Tyrosin-Transaminase ab (31). Außerdem wurde beobachtet, daß die Glutamat-Transaminase der Leber bei tragenden Ratten signifikant geringer ist als bei Normaltieren (21 Tage nach Beginn der Trächtigkeit etwa 1/3 der Normaktivität (31)). Parallelversuche zeigen deutlich, daß die Cortisolinduktion zu dieser Zeit so stark gehemmt ist, daß praktisch kein Hormoneffekt beobachtet werden konnte. Selbst 100 mg Cortisol/kg Ratte, täglich über 4 Tage verabreicht, führten zu keinem Ansteigen der Transaminase-Aktivität. Wie zu erwarten stellte sich heraus, daß Östradiol (100 µg täglich über 4 Tage) die Ausgangsaktivität vermindert und die Cortisolinduktion inhibiert. Dieses Ergebnis wäre also mit den Erfahrungen von WEBER u. Mitarb. (32) zu vergleichen, die nach Applikation von Insulin (4 IE in Abständen von 15 Stunden) eine Hemmung der Pyrrolaseinduktion nachweisen konnten. Das Östradiol läßt sich nach Versuchen von WOLF (33) ebenso wie Insulin (s.o.) in die Reihe der Anabolika einordnen, die zu einer starken Inhibierung gelber Fermente führen. Die schon zitierten Ergebnisse von WIEDEMANN (15) zeigen weiterhin, daß dieses Hormon die Aktivität der L-Aminosäureoxydase auch in vitro stark herabsetzt, also sicher nicht durch Repression, sondern durch direkte Enzymhemmung wirksam wird.

Hinsichtlich der Beziehungen zum Pyridoxalphosphat wurden für die Glutamat-Transaminase ähnliche Verhältnisse beobachtet wie für die Tyrosin-Transaminase. Allerdings scheint eine Fermentaktivierung allein durch das Coenzym nicht möglich zu sein. Im Pyridoxinmangel konnte eine maximale Cortisolinduktion ebenfalls nur bei gleichzeitiger Gabe von Pyridoxalphosphat erhalten werden (29). Die de-novo-Synthese des Enzymproteins im Rahmen des Induktionsprozesses wurde von OTTO (34) unter Beweis gestellt.

Aus dieser kurzen Literaturzusammenstellung geht hervor, daß über einen eventuellen Zusammenhang zwischen "Flavinenzymaktivität" und "Enzymadaptation" noch keine Erfahrungen gewonnen worden sind. Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit an erster Stelle in Zusammenarbeit mit BREM (12) überprüft werden, ob sich eine Korrelation zwischen der Induktion der Tryptophanpyrrolase und der L-Aminosäureoxydase-Aktivität nachweisen läßt. Zweitens sollte festgestellt werden, ob der Hemmstoff der RNS-Synthese - das Actinomycin - gelbe Fermente inhibiert, d.h. ob die Unterdrückung der Cortisolinduktion durch dieses Antibiotikum auch über eine Hemmung der Oxydation essentieller Aminosäuren erklärt werden könnte. An dritter Stelle war dann noch, gewissermaßen zur Abrundung aller in der Literaturübersicht zusammengefaßten Befunde, die Frage zu klären, warum bisher keine Sub-

stratinduktion der Glutamattransaminase erzielt wurde. Nach der hier vertretenen Anschauung müßte dieser Versuch nämlich positiv verlaufen, wenn entsprechenden Versuchstieren eine Kombination von Alanin und α-Ketoglutarat angeboten wird.

III. MATERIAL UND METHODIK

1. Verwendete Präparate

Alle Biochemikalien wurden von der Fa. C. F. BOEHRINGER, Mannheim, bezogen. Cortisol erhielten wir von der SCHERING AG, Berlin ("Scheroson F"). Actinomycin wurde freundlicherweise von der Fa. BAYER, Leverkusen, zur Verfügung gestellt, wofür an dieser Stelle herzlich gedankt sei. L-Alanin stammt von der MERCK AG. und α-Ketoglutarsäure von der FLUKA, Buchs/Schweiz.

2. Tiermaterial

Für alle Versuche wurden Sprague-Dawley-Ratten (100 - 150 g Körpergewicht) verwendet. Die Tiere stammten zum größten Teil aus der Zucht des Instituts für Tierphysiologie und waren über viele Generationen mit einer institutseigenen Spezialdiät ("Zuchtfutter grün") gefüttert worden. Das "Zuchtfutter grün" ist folgendermaßen zusammengesetzt:

Weizenschrot	45
Maisschrot	33
Sojaschrot	15
Magermilchpulver	3
Luzernegrünmehl	2
Mineralstoffmischung +	2

\+ 40 % kohlensaurer Futterkalk
30 % phosphorsaurer Futterkalk
24.5 % Viehsalz
5 % Magnesiumphosphat
0.5 % Spurenelemente (als Sulfate)
(Fe : Cu : Mn : Co = 5 : 1.5 : 1 : 2)

Für einige Versuche mußten auch zugekaufte Ratten herangezogen werden, die "Altromin-R" (Fa. ALTROGGE, Lage/Lippe) erhalten hatten, das wie folgt zusammengesetzt ist:

Gerste	48
Hafer	18
Mais	12
Luzernegrünmehl	4
Eiweißkonzentrat+	17
Dicalciumphosphat	1

+ 40 % Fischmehl (65 % Rohprotein)
37 % Tierkörpermehl (65 % Rohprotein)
16 % Waldhof-Trockenfutterhefe
7 % Futterknochenschrot (unentleimt)

Vom Hersteller werden pro kg Fertigfutter folgende Wirkstoffanteile garantiert:

Vitamine	Spurenelemente (als Sulfate)
10.000 IE Vitamin A	370 mg Mg
1.000 IE Vitamin D_3	33 mg Fe
25 mg Vitamin E	15 mg Cu
	10 mg Mn
	10 mg Zn
	0.05 mg Co

Das Futter wurde den Tieren zum Teil 12 Stunden vor dem Versuch entzogen; Wasser stand immer ad libitum zur Verfügung. Es ist jeweils im Text vermerkt, welche Tiere für die einzelnen Versuchsreihen verwendet worden sind. Zwischen Männchen und Weibchen wurde kein prinzipieller Unterschied festgestellt, so daß dieser Punkt bei der Auswertung der Ergebnisse unberücksichtigt bleiben konnte.

3. Erfassung der L-Aminosäureoxydase

Die Geschwindigkeit der Aminosäureoxydation wurde anhand der Formazanbildung aus Tetrazolpurpur verfolgt (35). Zur Ausschaltung von Transaminasen wurden dem Ansatz 10^{-3} M (Endkonzentration) Hydroxylamin zugesetzt und außerdem mit L-Leucin als Substrat gearbeitet, das mit besonders geringer Geschwindigkeit von Transaminasen umgesetzt wird. Das Enzym ist in

den Mitochondrien lokalisiert und wird daher am besten aus einer Mitochondriensuspension bestimmt.

Sollte in Zusammenarbeit mit BREM (12) neben der Tryptophanpyrrolase und dem Glykogengehalt der Leber die Aktivität der L-Aminosäureoxydase miterfaßt werden, so wurde nach dem Töten der Tiere (Dekapitation) ein Teil der Leber (1 - 2 g) abgewogen, im POTTER-ELVEHJEM (36) homogenisiert (Medium: 0.3 M Saccharose, 10 mM Triäthanolamin-Puffer, pH 7.2, und 2 mM Titriplex III (MERCK)) und zur Entfernung unzerkleinerter Zellbestandteile und der Zellkerne 5 Minuten bei 3.000 Upm zentrifugiert. Dann wurde die Mitochondrienfraktion bei 20.000 Upm innerhalb 15 Minuten sedimentiert, einmal mit demselben Rohrzucker-Puffermedium und einmal mit einer titriplexfreien Rohrzucker-Pufferlösung gewaschen. Um den Proteingehalt etwa konstant bei 15 mg/m zu halten, wurden bei der Herstellung der Endsuspension pro g Leber 1.1 ml Rohrzucker-Pufferlösung zugegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in Zentrifugengläser von 10 - 15 ml Inhalt pipettiert; alle Arbeitsgänge müssen so schnell wie möglich durchgeführt werden, weil die Enzymaktivität mit der Zeit abnimmt.

Ansatz:

0.04 ml Methylenblau-Lösung (0.2 %ig)
0.12 ml Tetrazolpurpur (MERCK) 0.5 %ig
0.16 ml Tris-Puffer, pH 8.2 (mit Titriplex III (MERCK) $8.4 \cdot 10^{-4}$ M (= 313 mcg/ml) und 530 mcg Hydroxylaminsulfat = 10^{-3} M in der Endkonzentration des Ansatzes)
0.1 ml L-Leucin-Lösung (20.4 mg/ml = $3 \cdot 10^{-2}$ M in der Endkonzentration des Ansatzes)
0.1 ml Mitochondriensuspension (= 1.0 - 1.5 mg Protein)

Parallel lief ein Blindversuch, der mit einem Trispuffer angesetzt war, welcher 42.9 mg Ammoniumsulfat/ml enthielt (= 10^{-1} M in der Endkonzentration des Ansatzes). Die Ammonium-Ionen hemmen in dieser Konzentration die L-Aminosäureoxydase vollständig, während andere, bei dieser Arbeitsweise einen Blindwert liefernden gelben Fermente nicht oder nur unwesentlich inhibiert werden, so daß sich aus der Differenz der Formazanbildung zwischen dem ammoniumfreien und dem ammoniumhaltigen Ansatz die Enzymaktivität berechnen läßt. Um einen brauchbaren Durchschnittwert zu erhalten, wurden pro Versuch mindestens 6 Hauptwerte und 3 Blindwerte angesetzt.

Anschließend kamen die Gläser in einen Exsikkator, der in ein Wasserbad von 37° C eingestellt und so weit mit Glycerin gefüllt war, daß die Gläser etwa 2 cm in das Glycerin hineinreichten. Der Exsikkator wurde auf etwa 8 mm evakuiert (Ölpumpe) und bei diesem Druck 45 Minuten belassen. Während dieser Zeit verläuft die Fermentreaktion linear (37). Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Gläser herausgenommen, in jedes Glas 1 Tropfen N HCl, 1.5 ml Aceton und 4.5 ml Tetrachlorkohlenstoff pipettiert, 15 Sekunden kräftig geschüttelt, zentrifugiert und die (blaue) wäßrige Phase mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgezogen. Das in der organischen Phase vorliegende Formazan wurde kolorimetriert und die Meßwerte mit Hilfe einer Eichkurve ausgewertet.

Zur Erstellung der Eichkurve wurden verschiedene Tetrazolpurpuranteile (10 - 40 nMol) mit Natriumdithionit quantitativ reduziert und die Purpurfärbung im Eppendorfgerät bei 492 nm (Schichttiefe 2 cm) vermessen. Die so gewonnene Eichkurve ist in der Abbildung 1 (Seite 12) wiedergegeben. Die Berechnung erfolgte in µMol Tetrazolpurpur (TP)/g Protein/45 Minuten (Eiweißbestimmung über Kjeldahl-N x 6.25). Die Streubreite liegt bei ± 15 %.

4. Bestimmung der Butyryl-CoA-Dehydrogenase

Um die Wirkung des Actinomycins auf gelbe Fermente zu überprüfen, wurde neben der L-Aminosäureoxydase die Butyryldehydrogenase - als Beispiel einer Acyldehydrogenase - gemessen. Für diesen Test kann die unter (3) erhaltene Mitochondriensuspension ebenfalls verwendet werden. Als Substrat wurde S-Butyryl-N-Acetylcysteamin angeboten (38); als Elektronenacceptor diente statt Tetrazolpurpur das Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Folgender Ansatz wurde in entsprechende Zentrifugengläser von 10 - 15 ml Inhalt pipettiert:

0.04 ml Methylenblau-Lösung
0.12 ml TTC-Lösung (1 %ig)
0.16 ml Trispuffer, pH 7.4
0.1 ml Mitochondriensuspension (1 - 2 mg Protein)
0.1 ml Butyrylcysteamin (0.04 M) bzw. Wasser (Blindwert)

Die weitere Behandlung erfolgte wie oben angegeben. Für die Auswertung wurde mit TTC eine entsprechende Eichkurve aufgestellt (Abbildung 2, Seite 13). Die Berechnung erfolgte in µMol TTC/g Protein/45 Minuten. Die Streubreite des Testes wurde zu ± 10 % ermittelt.

Abbildung 1

Eichkurve für Tetrazolpurpur

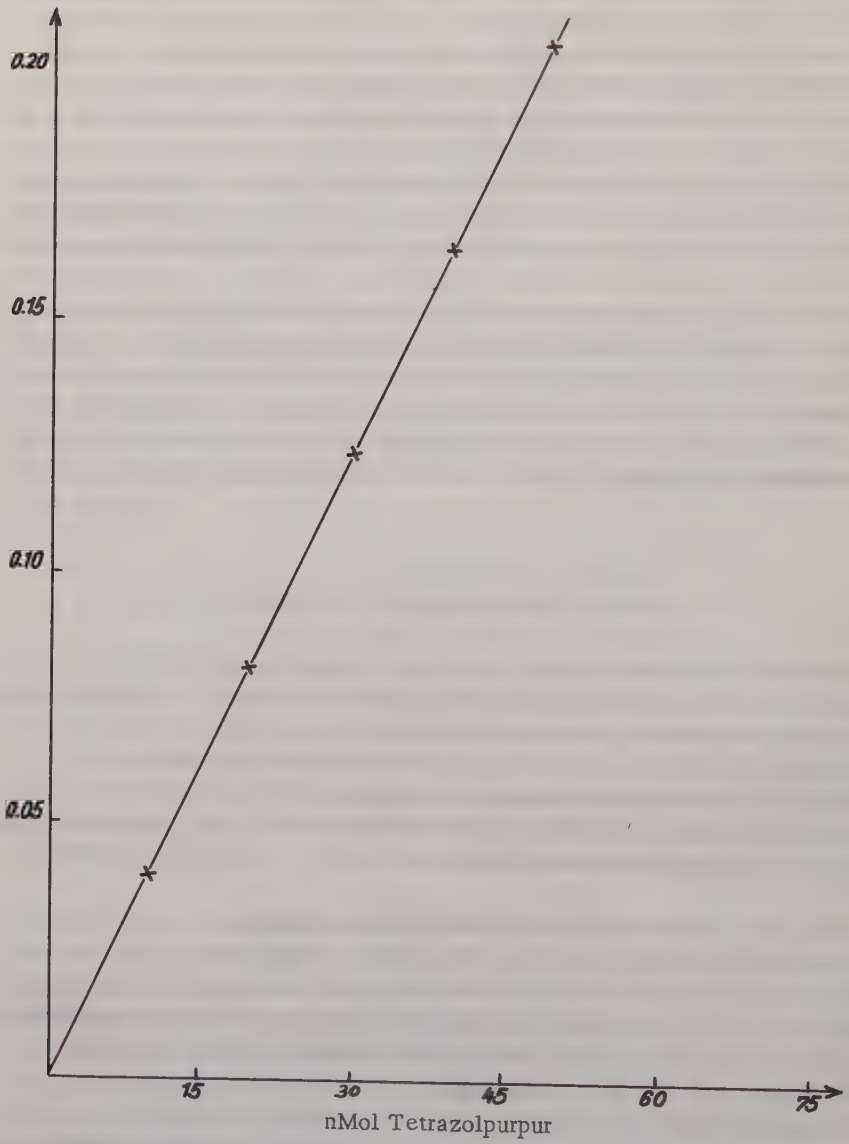
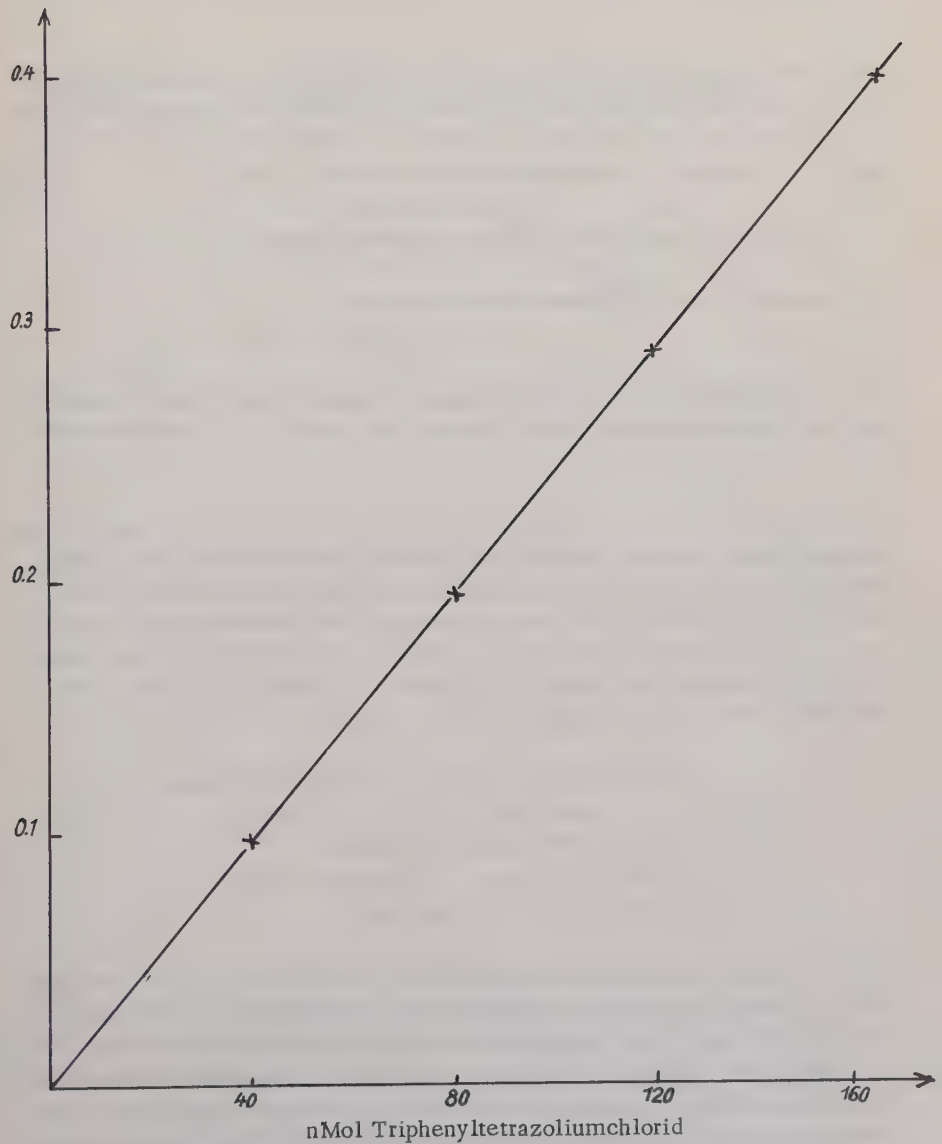


Abbildung 2

Eichkurve für Triphenyltetrazoliumchlorid



5. Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)

Die Glutamat-Transaminase wurde unter Verwendung von Lactatdehydrogenase (LDH) als Indikatorenzym enzymatisch-optisch erfaßt (39). Man mißt die Aktivität an der zeitlichen Zunahme des Pyruvats. Dieses wird in zweiter Reaktion zu Lactat umgesetzt, unter Verbrauch von NADH (G 1 und 2):

$$\text{L-Alanin} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \overset{\text{GPT}}{\rightleftharpoons} \text{Pyruvat} + \text{L-Glutamat} \qquad (1)$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \overset{\text{LDH}}{\rightleftharpoons} \text{Lactat} + \text{NAD}^+ \qquad (2)$$

Der NADH-Verbrauch ist der Transaminase-Aktivität proportional. Er läßt sich mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für NADH (3.3 cm^2/μMol bei 366 nm) berechnen.

Um die Transaminase in der Leber messen zu können, wurden 600 mg des frisch entnommenen Organs in der unter (3) beschriebenen Rohrzucker-Pufferlösung (ohne Titriplex III) bei 4° C homogenisiert (BÜHLER-Homogenisator) und 5 Minuten bei gleicher Temperatur zentrifugiert. Der Überstand konnte zum Test verwendet werden, und zwar so verdünnt, daß innerhalb 1 Minute eine Extinktionsänderung um etwa 0.01 - 0.02 erreicht wurde. Der Ansatz war folgendermaßen zusammengesetzt (Küvette, Schichttiefe 1 cm):

2.72 ml Phosphat-Alanin-Lösung (0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.4; 1.3 M L-Alanin)
0.04 ml NADH-Lösung (10 mg/ml)
0.04 ml LDH-Lösung (0.5 mg Protein/ml)
0.1 ml verdünntes Homogenat

Der Küvetteninhalt wurde gut gemischt und 5 - 10 Minuten auf 25° C temperiert. In dieser Zeit reagiert das Pyruvat des Homogenates mit NADH und LDH. Anschließend wurde die Transaminase-Reaktion durch Einwirbeln von 0.1 ml α-Ketoglutarat-Lösung (0.9 M) gestartet und über 5 Minuten jede Minute die Extinktion notiert. Die Reaktion verläuft im allgemeinen streng linear. Entsprechend wurde ein Blindwert angesetzt, damit das erhaltene Ergebnis um die GPT-Aktivität korrigiert werden konnte, die eventuell als Verunreinigung in

dem verwendeten LDH-Präparat enthalten sit. Die Werte wurden gemittelt, der Blindwert abgezogen und die Aktivität nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} = \mu\text{Mol Substratumsatz/ml Probevolumen/Minute}$$

Es gilt:

E = Extinktionsänderung/Minute
V = Küvettenvolumen
ε = Extinktionskoeffizient für NADH bei 366 nm (3,3 $cm^2/\mu Mol$)
d = Schichttiefe der Küvette
v = Probevolumen

Die Aktivität wird in µMol Substratumsatz/Minute/g Protein (Kjeldahl-N x 6.25) angegeben.

IV. ERGEBNISSE

1. Beziehung zwischen L-Aminosäureoxydase-Aktivität und Induktion der Tryptophanpyrrolase

Die erste Versuchsreihe sah vor, eine eventuelle Korrelation zwischen Cortisolinduktion und L-Aminosäureoxydase-Aktivität aufzuzeigen. Hierfür wurden Ratten von etwa 150 g Körpergewicht verwendet, die "Zuchtfutter grün" erhalten hatten. Die Tiere wurden über Nacht ausgenüchtert und bekamen mit der Schlundsonde 2.5 mg Cortisol/100 g Körpergewicht. Zu verschiedenen Zeiten nach der Hormonapplikation wurden die Aktivität der Tryptophanpyrrolase und der Glykogengehalt (BREM (12)) und die Aktivität der L-Aminosäureoxydase in der Leber bestimmt. In der Tabelle 1 (Seite 17) sind alle Werte zusammengestellt, die zu verschiedenen Zeiten nach der Hormongabe für die L-Aminosäureoxydase erhalten worden sind. Die Aktivierung der Aminosäureoxydation liegt demnach schon 1/4 Stunde nach der Hormongabe bei fast 100 %, um innerhalb von 4 Stunden über 500 % zu erreichen. In der Abbildung 3 (Seite 18) sind alle erfaßten Parameter (Tryptophanpyrrolase, Glykogengehalt und L-Aminosäureoxydase) graphisch dargestellt worden. Es ist deutlich zu erkennen, daß die L-Aminosäureoxydase zuerst (nach 1/4 Stunde) ansteigt, während die Pyrrolase erst nach 1 Stunde signifikant erhöht ist.

2. Hemmung der L-Aminosäureoxydase und Butyryldehydrogenase durch Actinomycin C

In diesem zweiten Abschnitt ist untersucht worden, ob das Antibiotikum Actinomycin die Aktivität gelber Fermente beeinflußt. Nach der bisher vorliegenden Literatur haben sich die L-Aminosäureoxydase und die Butyryl-CoA-dehydrogenase gegenüber Hemmstoffen als besonders empfindlich erwiesen, so daß bei diesen beiden Enzymen in erster Linie ein Ausschlag zu erwarten war. Außerdem schien die L-Aminosäureoxydase für die Induktion von Enzymen des Proteinstoffwechsels von besonderer Bedeutung zu sein.

Tabelle 1

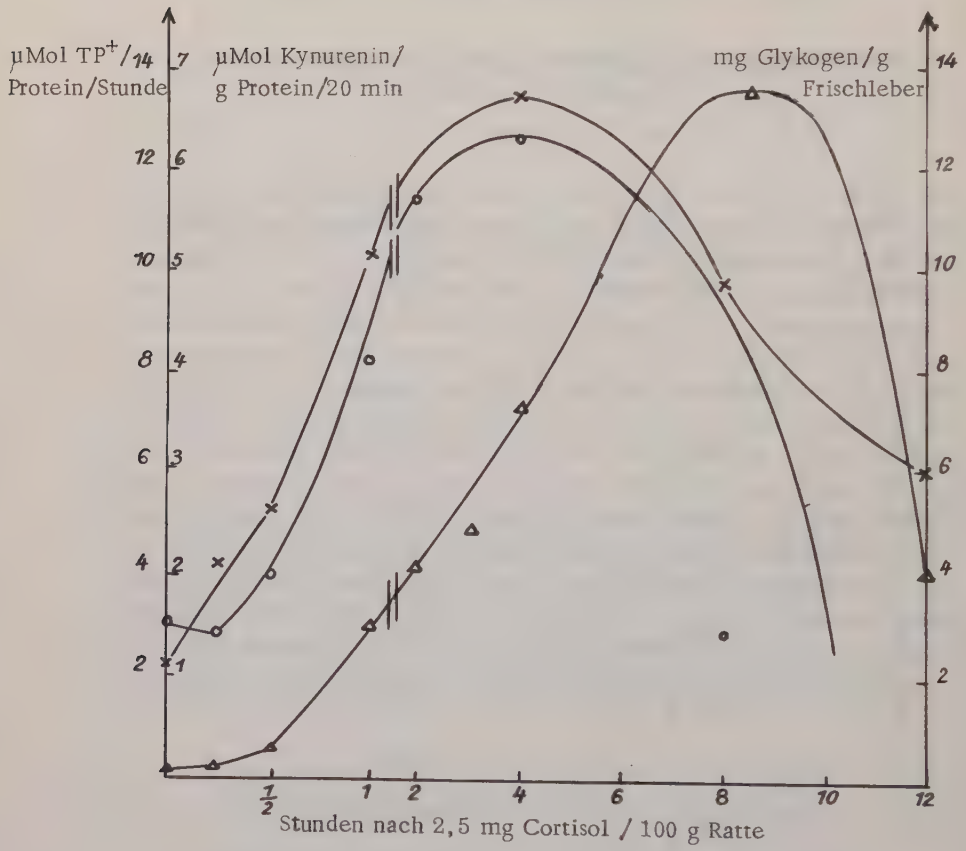
Beeinflussung der L-Aminosäureoxydase (L-AO) durch Cortisol
(einmalig 2.5 mg p.o.)

Zeit bis zur Tötung (Stunden)	L-AO µMol TP^+/g Protein/ 45 Minuten	Aktivierung %	Tierzahl
0	2.2 ± 0.4	-	10
1/4	4.2 ± 1.1	91	10
1/2	5.3 ± 2.0	141	6
1	10.3 ± 3.7	368	10
2	12.4 ± 3.5	463	10
4	13.6 ± 4.2	519	10
8	9.7 ± 4.1	341	6
12	6.0 ± 3.0	173	6

+ TP = Tetrazolpurpur

Abbildung 3

L-Aminosäureoxydase, Tryptophanpyrrolase und Glykogen der Rattenleber nach Cortisolgabe
(Mittelwerte aus 4 - 10 Tieren; vgl. auch BREM (12))



+TP = Tetrazolpurpur

Auch in diesem Falle sind Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 150 g verwendet worden, die "Zuchtfutter grün" erhalten hatten. Die Ansätze konnten wie unter (IV. 1) beschrieben behandelt werden (vgl. Seite 16), nur wurden mit Hilfe der Pufferlösung steigende Anteile des Antibiotikums eingebracht. Für die Testung der Butyryldehydrogenase wurden Butyrylcysteamin als Substrat und Triphenyltetrazoliumchlorid als Elektronenakzeptor zugesetzt (vgl. Seite 11). Die Abbildung 4 (Seite 20) zeigt deutlich, daß beide Enzymaktivitäten mit steigender Actinomycinkonzentration abnehmen. Die L-Aminosäureoxydase wird - wie zu erwarten (vgl. Seite 4) - stärker inhibiert als die Acyldehydrogenase.

3. Induktion der Glutamat-Pyruvat-Transaminase durch Substrat

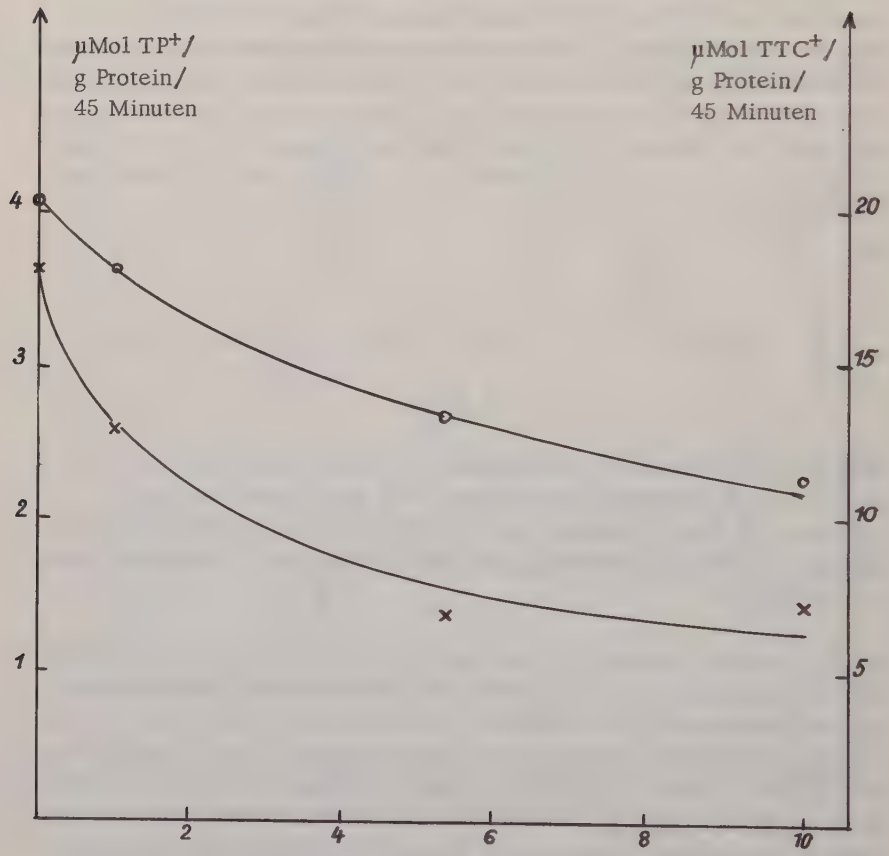
Nach dem Versuchsplan sollte im dritten Abschnitt dieser Arbeit überprüft werden, ob die Glutamat-Transaminase durch kombinierte Substratgabe (L-Alanin + α-Ketoglutarsäure) induzierbar ist, oder ob hier ein Sonderfall vorliegt, in dem die Neubildung eines Enzyms nur durch ein Hormon eingeleitet werden kann.

Um die eigenen Ergebnisse mit den nach der Literatur schon vorliegenden Meßwerten vergleichen zu können, wurden Vergleichsversuche mit Cortisol und Pyridoxalphosphat ebenfalls angesetzt. Die verwendeten Ratten (120 - 150 g Körpergewicht) waren zum Teil mit "Zuchtfutter grün", zum Teil mit Altromin gefüttert worden. Vorversuche zeigten aber, daß die unterschiedliche Fütterung weder bei den Normalwerten noch hinsichtlich der Ansprechbarkeit auf Cortisol zu signifikanten Differenzen führte. Das Cortisol wurde jeweils mit der Schlundsonde, die Substrate und das Pyridoxalphosphat s.c. verabfolgt. Die Zeiten, die zwischen der Behandlung und der Tötung der Tiere verstrichen sind, ergeben sich aus den Tabellen 2 - 4 (Seite 21 - 23), in denen die Ergebnisse zusammengestellt sind. Bei allen Versuchen, die länger als 24 Stunden dauerten, wurden die Substrate bzw. das Hormon täglich zugeführt. Die Tötung erfolgte dann 24 Stunden nach der letzten Applikation.

Aus den Tabellen 2 - 4 ist deutlich zu erkennen, daß die Glutamat-Transaminase zwar nicht sehr stark, aber hoch signifikant sowohl durch Hormon als auch

Abbildung 4

Hemmung der L-Aminosäureoxydase und Butyryl-CoA-Dehydrogenase durch Actinomycin C in vitro (Lebermitochondrien)



× —— × L-Aminosäureoxydase

o —— o Butyryl-CoA-Dehydrogenase

+TP = Tetrazolpurpur

TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid

Tabelle 2

Beeinflussung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase der Leber durch Cortisol (Angaben in µMol Pyruvat/Minute/g Protein; Meßtemperatur 25° C)

Zeit bis zur Tötung (Stunden)	Kontrolle 0.5 ml NaCl (0.9 %ig)	Tierzahl	5 mg Cortisol/ 100 g KG	Tierzahl
0 (keine NaCl-Gabe)	58.0 ± 3.8	6		
1/2	59.1 (1 Wert)	1		
2	59.5 ± 2.2	10	78.8 (2 Werte)	2
24			90.5 ± 5.1	4
48	57.1 ± 5.7	4	101.4 ± 4.9	7
72	60.4 ± 5.1	4	87.3 ± 9.3	4
96			96.9 ± 11.7	4
120	58.3 ± 6.9	4	80.5 ± 15.6	4

Tabelle 3

Beeinflussung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase der Leber durch L-Alanin, α-Ketoglutarsäure und einer Kombination von L-Alanin + α-Ketoglutarsäure

(Angaben in µMol Pyruvat/Minute/g Protein; Meßtemperatur 25° C)

Zeit bis zur Tötung (Stunden)	0.5 mMol L-Alanin	Tier-zahl	0.5 mMol α-Ketoglutarsäure	Tier-zahl	O.5 mMol L-Alanin + 0.5 mMol α-Ketoglutarsäure	Tier-zahl
1/2	58.9 (3Werte)	3	53.8 (2Werte)	2	66.8 (1Wert)	1
1	63.2 ± 5.1	4	57.1 ± 5.0	4	76.6 ± 6.3	4
2	61.5 ± 3.8	5	56.8 ± 5.7	4	82.7 ± 6.1	4
	61.8 (1 Wert)					
3 1/2			60.5 ± 3.9	5		
24	61.3 ± 4.7	7	52.2 (2Werte)	2		
48	62.8 ± 6.3	4	56.4 ± 6.3	4	84.1 ± 7.3	4
72	64.2 ± 5.1	4	60.6 ± 5.8	4	88.8 ± 6.2	6
168					87.1 ± 9.1	4

Tabelle 4

Beeinflussung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase der Leber durch Substratgaben
(Tötung 2 Stunden nach der Substratapplikation)

(Meßtemperatur 25° C)

Substrat bzw. Coenzym (pro 100 g Körpergewicht)	µMol Pyruvat/ Minute/g Protein	Tierzahl
0.5 ml NaCl (0.9 %ig) + 30 mg Pyridoxalphosphat	66.1 ± 7.3	4
0.5 mMol L-Alanin + 30 mg Pyridoxalphosphat	101.4 ± 11.5	5
0.5 mMol α-Ketoglutarsäure + 30 mg Pyridoxalphosphat	96.5 ± 16.1	4
0.5 mMol L-Alanin + 0.5 mMol α-Ketoglutarsäure + 30 mg Pyridoxalphosphat	103.9 ± 15.7	4
5 mg Cortisol + 30 mg Pyridoxalphosphat	107.8 ± 19.1	4

durch die Substratkombination induzierbar ist. Die Einzelsubstrate vermögen die Enzymaktivität nicht zu steigern, was den amerikanischen Befunden (vgl. Seite 5) entsprechen würde. Bei gleichzeitiger Zuführung des Cofermentes Pyridoxalphosphat ist dagegen auch durch separate Verabreichung einer Substratkomponente eine Induktion möglich, wie die Tabelle 4 zeigt. Die kombinierte Substratgabe ist hier nicht wirksamer. Auch der Cortisoleffekt ist bei gleichzeitiger Coenzymgabe deutlich größer, wenn man bedenkt, daß alle Versuche mit Pyridoxalphosphat nur über 2 Stunden ausgedehnt worden sind. Die Induktionen durch Cortisol bzw. durch die Substratkombination sind zur besseren Übersicht in den Abbildungen 5 und 6 (Seite 25 und 26) noch einmal graphisch dargestellt.

Abbildung 5

Induktion der Glutamat-Pyruvat-Transaminase durch Cortisol
(5 mg/ 100 g Körpergewicht; Rattenleber)

(vgl. Tabelle 2, S. 21)

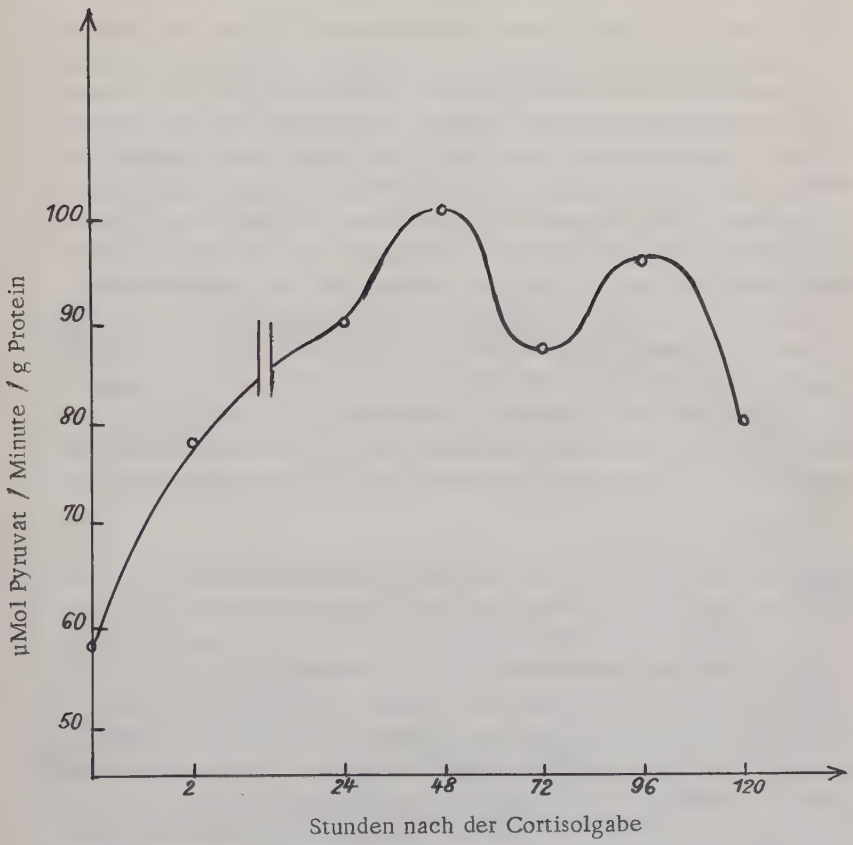
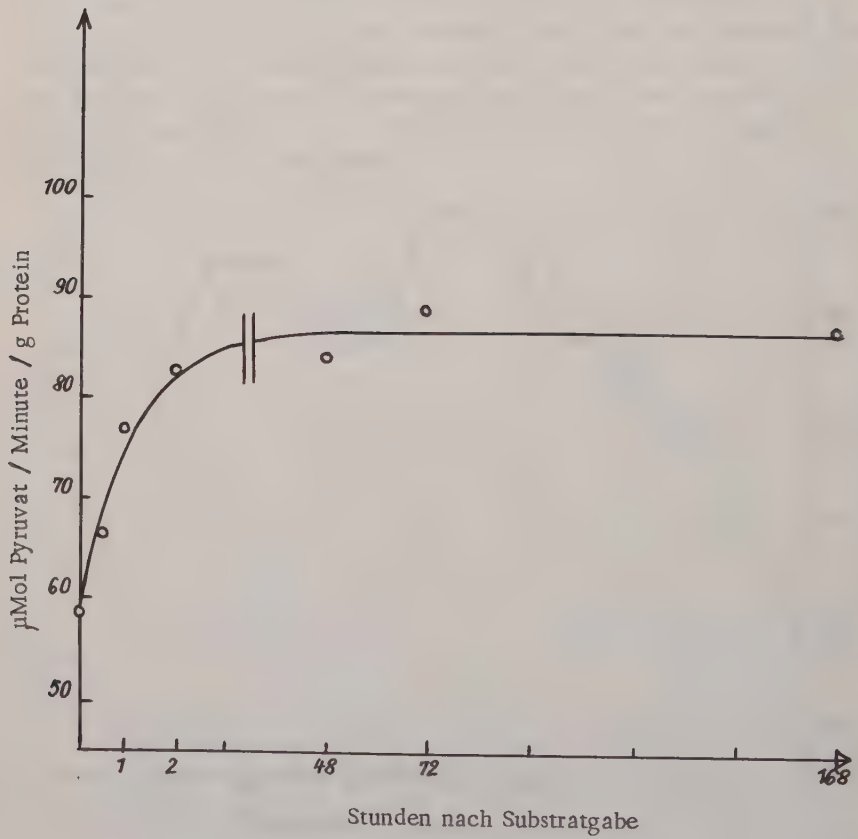


Abbildung 6

Induktion der Glutamat-Pyruvat-Transaminase der Leber durch kombinierte Verabreichung von L-Alanin + α-Ketoglutarsäure

(vgl. Tabelle 3, S. 22)



V. DISKUSSION

Betrachtet man die gewonnenen Ergebnisse, so lassen sich drei wesentliche Befunde herausstellen:

1. Die Aktivität der L-Aminosäureoxydase steigt in der Leber nach Cortisolgaben (2.5 mg/100 g Ratte) ganz erheblich (über 500 % innerhalb von 4 Stunden). Wichtig ist weiterhin, daß die erste Aktivitätszunahme bereits 15 Minuten nach der Hormongabe auftritt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Tryptophanpyrrolase noch nicht erhöht. Eine Enzyminduktion ist auch in so kurzer Zeit äußerst unwahrscheinlich, weil das Hormon p.o. appliziert wurde, also ein gewisser Zeitraum für die Resorption, den Transport in die Leberzellen und schließlich für den eigentlichen Induktionsprozeß eingeräumt werden muß. Die Versuche von WIEDEMANN (15) haben gezeigt, daß der Cortisoleffekt auf die L-Aminosäureoxydase in vitro ebenfalls nachweisbar ist und daher mit großer Wahrscheinlichkeit als Enzymaktivierung und nicht als Induktion zu deuten ist. Damit wäre die wichtigste Voraussetzung für die "Substrattheorie" erfüllt: Das für die Pyrrolaseinduktion als Ventilferment in Frage kommende Enzym wird durch das Hormon stark aktiviert und die Aktivitätszunahme liegt vor der Pyrrolasevermehrung.

2. Die zweite Versuchsreihe zeigt deutlich, daß die L-Aminosäureoxydase durch Actinomycin gehemmt wird. Der Effekt ist schon bei einer Antibiotikumkonzentration von 0.75 µg/ml Testlösung nachweisbar, also in einem Konzentrationsbereich, der für die Hemmung der RNS-Synthese charakteristisch ist. Nach Versuchen von BREM (12) läßt sich die Cortisolinduktion der Pyrrolase verhindern, wenn gleichzeitig mit dem Hormon ein Hemmstoff der L-Aminosäureoxydase verabreicht wird. Als Hemmstoff wurden Insulin und Chlortetracyclin (Aureomycin) eingesetzt, welche die RNS-Synthese sehr wahrscheinlich unbeeinflußt lassen, weil sie als nicht toxisch und als typische Anabolika bekannt sind. Es ist also gut möglich, daß die Wirkung des Actinomycins ebenfalls auf einer Inhibierung der L-Aminosäureoxydation beruht, durch den der katabole Effekt der Cortisols auf den Proteinstoffwechsel kompensiert werden könnte. Damit würde die Anlieferung von Reaktionsprodukten des Aminosäureabbaus, insbesondere aus dem Abbau essentieller Aminosäuren, wegfallen. Aber auch die Störung der Proteinsynthese, im wesentlichen bedingt durch die Oxydation

der im Minimum befindlichen essentiellen Bausteine, würde ausbleiben. Der Amino-N-Gehalt der Leber dürfte dann bei gleichzeitiger Gabe von Cortisol und Actinomycin nicht ansteigen, wie es nach separater Cortisolgabe beobachtet worden ist (11). Die Amino-N-Analyse, die hier noch nicht durchgeführt worden ist, könnte eventuell weitere Aussagen darüber ermöglichen, wie man sich die Hemmung der Cortisolinduktion durch Actinomycin vorzustellen hat.

3. Der dritte Abschnitt des experimentellen Teils hat schließlich ergeben, daß es sich bei der Glutamat-Pyruvat-Transaminase nicht um ein besonderes Enzym handelt, das nur durch Hormone induziert werden kann, sondern daß auch in diesem Fall Hormon- und Substratinduktion parallel verlaufen. Voraussetzung für die positive Reaktion des Substrates ist die gleichzeitige Zuführung beider Substratpartner, also der stickstoffabgebenden und der stickstoffaufnehmenden Verbindung. Eine ausreichende Enzymstabilisierung durch das Substrat (s.u.) kann verständlicherweise nur erfolgen, wenn beide Reaktionspartner anwesend sind. Wird z.B. nur Alanin zugeführt, so muß die Reaktion - entsprechend den Gleichgewichtsbedingungen - zum Stillstand kommen, wenn das Pyridoxalphosphat in Pyridoxaminphosphat übergegangen ist. Die Stickstoffabgabe wäre dann nicht möglich.

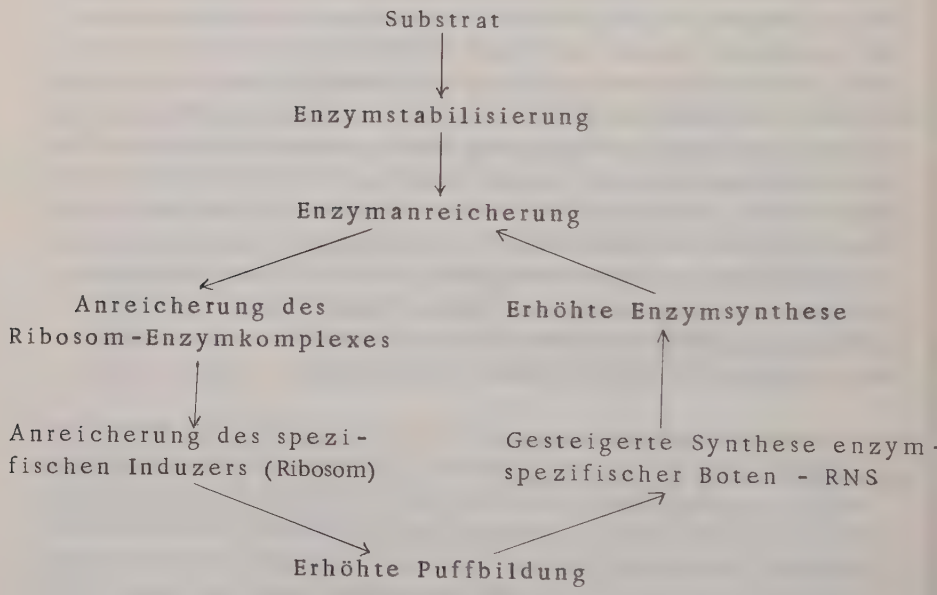
Abschließend läßt sich feststellen, daß die gewonnenen Ergebnisse weitere Hinweise dafür liefern, daß die Enzyminduktion durch Cortisol über eine Änderung von Substratspiegeln zustande kommt. Es liegen Beweise dafür vor, daß die Ventilfermentaktivierung nicht durch Induktion, sondern durch einen direkten Stimulationsprozeß eingeleitet wird (15). Auch die theoretischen Grundlagen dieser Stimulation sind auf molekularer Basis diskutiert worden (10). Damit würde die Induktion von Enzymen zum Sekundärphänomen der Hormonwirkung, das mit dem eigentlichen Hormoneffekt in keinem direkten Zusammenhang steht. Die Substratspiegeländerung könnte sich z.B. auch alimentär ergeben, etwa durch Umstellung von einer proteinreichen auf eine fett- oder kohlenhydratreiche Diät. Auch in diesem Fall lassen sich, ohne daß Hormonspiegel geändert zu werden brauchen, die zu erwartenden Variationen in den Enzymmustern beobachten. Entsprechende Beispiele liegen in der Literatur vor (40).

Jetzt wäre noch zu diskutieren, wie eine Enzyminduktion durch Substratspiegeländerung zustande kommen könnte. Nach (10) ist als Primäreffekt die Stabilisierung des Enzyms durch das Substrat anzunehmen. Der Enzym-Substratkomple

ist nämlich gegenüber Denaturierung und Proteolyse wesentlich unempfindlicher als das freie Enzym (41). Dadurch wird eine Enzymanreicherung bewirkt. Würde nun ein Gleichgewicht zwischen dem Enzym-Substrat- und dem Ribosom-Enzymkomplex, der das frisch synthetisierte, aber noch nicht abgelöste Enzym beherbergt, existieren, so hätte die Enzymanreicherung auch die Vermehrung des Ribosom-Enzymkomplexes zur Folge, mitbedingt durch die experimentell gesicherte Tatsache, daß die auf dem Ribosom angeheftete Boten-RNS außerordentlich ribonukleaseempfindlich ist. Die Ribonukleasewirkung würde aber durch das Protein an der Oberfläche behindert. Berücksichtigt man jetzt noch den schon von verschiedenen Seiten diskutierten Gedanken, daß die Ribosomen selbst bzw. Teile derselben Induzerfunktion besitzen, so würden sich mit dem Ribosom-Enzymkomplex auch die Induzer anreichern, was zu erhöhter "Puffbildung", also zu einer gesteigerten Aktivität entsprechender Genzentren führen muß. Die Folge wäre eine verstärkte Bildung enzymspezifischer Boten-RNS, die wiederum eine spezifische Enzymsynthese nach sich zieht. Es würde sich ein Kreisprozeß ergeben, der nur durch das Auftreten von entsprechendem Substrat im Cytoplasma der Zelle eingeleitet wird und sich zugunsten der spezifischen Enzymsynthese "aufschaukelt". Der Kreisprozeß ist in der Abbildung 7 (Seite 30) noch einmal zusammengefaßt. Es handelt sich natürlicherweise um ein hypothetisches Bild, in dem bisher nur einige experimentell gesicherte Fakten enthalten sind.

Abbildung 7

SCHEMA ZUR ENZYMINDUKTION



VI. ZUSAMMENFASSUNG

In drei Versuchsreihen an Ratten wurde der Frage nachgegangen, ob die Induktion von Leberenzymen durch Cortisol direkt über eine Beeinflussung des genetischen Materials oder indirekt über eine Variation von Substratspiegeln zu erklären ist. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Induktion der Tryptophanpyrrolase wird von einer starken Aktivierung der L-Aminosäureoxydase begleitet, die der Pyrrolasevermehrung zeitlich vorauseilt. Die Steigerung der Aminosäureoxydation ist schon 15 Minuten, die Pyrrolaseinduktion mit Sicherheit erst 1 Stunde nach der Cortisolgabe nachweisbar. (s. auch BREM (12)).

2. Actinomycin C hemmt die L-Aminosäureoxydase und die Butyryl-CoA-Dehydrogenase in vitro ebenso wie Insulin oder Chlortetracyclin, und zwar in einem Konzentrationsbereich, der für die Hemmung der RNS-Synthese charakteristisch ist.

3. Die Glutamat-Pyruvat-Transaminase ist sowohl durch Cortisol als auch durch kombinierte Zuführung von L-Alanin und α-Ketoglutarsäure induzierbar. Die separate Verabreichung eines Substratpartners führt nicht zur Enzymvermehrung. Bei gleichzeitiger Verabreichung von Pyridoxalphosphat verwischen sich diese Unterschiede.

Es wird diskutiert, daß die erhobenen Befunde mit der "Substrat-Theorie" vereinbar sind, nach der die Cortisolinduktion auch über eine primäre Substratspiegeländerung erklärt werden kann.

VI. Conclusion

In three series of experiments the question was examined whether the induction of liver enzymes by cortisol can be explained directly by an influence on the genetic material or indirectly by a variation of substrate levels. These experiments were carried out with rats. The results obtained can be summed up as follows:

1. The induction of the tryptophanepyrrolase is accompanied by a strong activation of the L-amino-acid oxidase which precedes in the time the pyrrolase increase. The increase of the amino acid oxydation can be proved already after 15 minutes, the pyrrolase induction with certainty only 1 hours after the adding of Cortisol.

2. Actinomycin C inhibits the L-amino acid oxydase and the butyryl-CoA dehydrogenase in vitro just in the same way as insulin or chlorotetracyclin and this in a concentration range which is characteristic for the inhibition of the RNS-synthesis.

3. The glutamate-pyruvate transaminase can be induced by Cortisol as well as by the combined addition of L-Alanine and α-ketoglutaric acid. The separate adding of a substrate partner does not lead to an enzyme increase. In case of simultaneous adding of pyrodoxale phosphate these differences are obscured.

It is argued that the findings are compatible with the "substrate theory" according to which the Cortisol induction can be explained also by a primary modification of the substrate level.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Jacob, F., J. Monod: J. molec. Biol. 3, 318 (1961)

2. Monod, J. in: "Enzymes: Units of biological structure and function" (ed. O. H. Gaebler) Academic Press, New York, 1956

3. Nesemann, G., H. J. Hübener, R. Junk, J. Schmidt-Thomé: Biochem. Z. 333, 88 (1960)

4. Clever, U., P. Karlson: Exp. Cell. Res. 20, 623 (1960)

5. Beermann, U.: Chromosoma (Berl.) 5, 139 (1952)

6. Jungblut, P. W., I. Hätzel, E. R. De Sombre, E. V. Jensen: 18. Kolloqu. d. Ges. f. Biol. Chem. Mosbach 1967

7. "Mechanisms of Hormone Action", herausgegeben von P. Karlson, G. Thieme (Stuttgart) 1965

8. "Action of Hormones on molecular Processes", ed. by G. Litwack and D. Kritchevsky, John Witly & Sons, New York, London, Sidney 1964

9. Karlson, P.: Dtsch. med. Wschr. 86, 668 (1961)

10. Schole, J.: Habilitationsschrift, München 1963

11. Weber, G., R. L. Singhal, S. K. Srivastava, in: "Advances in Enzyme Regulation" 3, 43 (1965)

12. Brem, S.: Dissertation (med.vet.), in Vorbereitung

13. Weik, H.: Dissertation (med.vet.), München 1964

14. Schole, H.: Dissertation (rer.nat.), TH München 1966

15. Wiedemann, H.: Dissertation (med.vet.), in Vorbereitung

16. Greengard, O., P. Feigelson: J. Biol. Chem. 237, 1903 (1962)

17. Feigelson, P., O. Greengard: J. Biol. Chem. 237, 3714 (1962)

18. Otte, W.: Dissertation (med.vet.), München 1964

19. Stössel, J.: Dissertation (med.vet.), München 1966

20. Civen, M., W.E. Knox: J. Biol. Chem. 234, 1787 (1959)

21. Knox, W. E.: Brit. J. Exp. Path. 32, 462 (1951)

22. Rosen, F., R. J. Milholland: J. Biol. Chem. 238, 3730 (1963)

23. Lin, E. C. C., W.E. Knox: J. Biol. Chem. 233, 1186 (1958)

24. Rosen, R., H. R. Harching, R. Milholland, C. A. Nichol: J. Biol. Chem. 238, 3725 (1963)

25. Kenney, F. T., R. M. Flora: J. Biol. Chem. 236, 2699 (1961)

26. Kenney, F. T.: Biol. Chem. 237, 1610 (1962)

27. Kenney, F. T.: ibid. 237, 3495 (1962)

28. Greengard, O.: "Advances in Enzyme Regulation" (ed. by G. Weber), Pergamon Press 2, 277 (1964)

29. Rosen, F., C. A. Nichol: "Advances in Enzyme Regulation", (ed. by G. Weber), Pergamon Press 2, 115 (1964)

30. Rosen, F., N. R. Roberts, C. A. Nichol: J. Biol. Chem. 234, 476 (1959)

31. Nichol, C. A., Rosen, F.: "Advances in Enzyme Regulation" (ed. by G. Weber), Pergamon Press 1, 341 (1963)

32. Weber, G., R. L. Singhal, N. B. Stamm, M. A. Lea: "Advances in Enzyme Regulation" (ed. by G. Weber), Pergamon Press 4, 59 (1966)

33. Wolf, F.: Dissertation (med.vet.), München 1964

34. Otto, K.: Naturwissenschaften 50, 355 (1963)

35. Kuhn, R., D. Jerchel: "Naturforschg. u. Medizin in Deutschland", Biochemie I, 59 (1947)

36. Potter, V. R., C. A. Elvehjem: J. Biol. Chem. 114, 495 (1936)

37. Schole, J.: unveröffentlicht

38. Seubert, W.: Dissertation (rer. nat.), München 1956

39. "Methoden der enzymatischen Analyse" herausgegeben von H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie, 1962

40. Fitch, W. M., I. L. Chaikoff: J. Biol. Chem. 235, 554 (1960)

41. Szalbolosi, G., E. Biszku: Biochem. Biophys. Acta (Amsterdam) 48, 335 (1961)

Am Ende der Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h.c. Johannes Brüggemann für die Überlassung des Themas und die guten Arbeitsbedingungen in seinem Institut herzlich danken.

Herrn Privatdozenten Dr. Dr. Jürgen Schole danke ich für seine mir jederzeit gewährte Unterstützung und Beratung.

LEBENSLAUF

Am 5. Oktober 1940 wurde ich als 5. Kind des Landwirtes Hans Eichinger und seiner Ehefrau Maria, geb. Brunhuber, in Eggenfelden geboren.

Nach Beendigung der 7. Klasse der Volksschule Unterdietfurt besuchte ich vier Jahre die Kurzform des humanistischen Gymnasiums Burghausen und drei Jahre das humanistische Gymnasium in Pfarrkirchen, wo ich im Sommer 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1960/61 begann ich in München zunächst Rechtswissenschaft zu studieren, um nach zwei Semestern das Studium der Tiermedizin aufzunehmen. Nach neunsemestrigem Studium in München legte ich im Sommer 1966 das Tierärztliche Staatsexamen ab.

Meine Praktikantenzeit leistete ich bei Herrn Dr. v. Dewitz in Vilsbiburg ab. Zur Zeit bin ich in Arnstorf/Ndb. in der tierärztlichen Praxis tätig.